(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129386

ایجاد بانک ژن و تعیین فاصله ژنتیکی میگوهای بومی خلیج فارس و دریای عمان

- **سعید تمدنی‌جهرمی*:** پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، بندر عباس، ایران
- **محسن گذری:** پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، بندر عباس، ایران
- **سجاد پورمظفر:** ایستگاه تحقیقاتی نرم‌تنان خلیج فارس، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات ، ترویج و آموزش کشاورزی، بندر لنگه، ایران
- **میترا آرمان:** گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
- **عبدالرضا جهانبخشی:** مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های دور، وسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، چابهار، ایران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۸

چکیده

وضعیت بحرانی زیستگاه و هم‌چنین آلودگی‌های نفتی حاصل از آب توازن نفتکش‌ها و هم‌چنین پساب مزارع پرورش میگو هم اینک موجب سرعت افول و انقراض ارگانیسم‌های زنده شده و گونه‌های مهم و اقتصادی منطقه را در خطر انقراض قرار داده است. از این‌رو ایجاد بانک‌های ژنومی از موجودات زنده در راستای نگه‌داری نسخه‌هایی از ژنوم ذخایر ارزشمند ژنتیکی از آبزیان مهم می‌باشد. در این مطالعه به امکان ایجادبانک ژن‌وشناسایی ژنتیکی ٤ گونه مهم ازمیگوهای‌منطقه خلیج‌فارس(*P. semisulcatus*، *P. indicus*، *P. merguiensis* و*P. monodon*) پرداخته شد. نمونه‌برداری از مناطق بوشهر، جاسک، گواتر و هرمز که مهم‌ترین زیستگاه‌های گونه‌های مورد مطالعه می‌باشد به‌روش ترال کف در مهر ماه سال ۹٦ انجام گرفت. استخراج DNA کل با استفاده از روش فنل – کلروفورم انجام گردید. پس از توالی‌یابی ژن SrRNA ١٦ میزان فاصله ژنتیکی بین توالی‌های به‌دست آمده سنجیده شد. نتایج نشان داد توالی‌هایی از دو مورفوتایپ از گونه ببری سبز متعلق به مناطق بوشهر و هرمزگان دارای اختلاف ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در حدود ۰/۰۳ درصد بودند. این میزان اختلاف تمایز این دو مورفوتایپ را در کلادهای مورد بررسی تایید نمود. بیش‌ترین فاصله ژنتیکی در میان گونه‌های خانواده پناییده بین گونه‌های *P. merguiensis* و *P. monodon* به‌میزان ۱۲ درصد و کم‌ترین فاصله ژنتیکی بین گونه‌های *P. indicus* و *P. monodon* به‌میزان۱۰ درصد ثبت گردید.

کلمات کلیدی: بانک ژن، SrRNA ۱۶، میگو، خلیج فارس، فاصله ژنتیکی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: stamadoni@gmail.com

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129386

مقدمه

شناسایی دقیق گونه‌های زیستی در مناطق جغرافیایی مختلف برای برنامه‌ریزی در جهت اجرای پروژه‌های حفاظت یا بازسازی ذخایر گو نه‌های در معرض انقراض به‌کار می‌آید. کنترل سریع و آسان ورود و خروج گونه‌ها در مرز کشورها و نیز پایش بازار درخصوص حضور فراورده‌های به‌دست آمده از گونه‌های مورد حمایت قانون از کاربردهای علوم ژنتیک (برای مثال استفاده از خط‌شناسه DNA) برای حفاظت از گونه‌های آسیب‌پذیر است (Ardura و همکاران، ۲۰۱۰؛ Eaton و همکاران، ۲۰۰۹). از مهم‌ترین زمینه‌های فعالیت تحقیقات ژنتیک آبزیان می‌توان به استفاده از اصول ژنتیک و زیست فناوری در افزایش میزان صید، مدیریت صحیح ذخایر ، مدیریت تکثیر و پرورش در قفس و هم‌چنین بازسازی ذخائر اشاره کرد. هم‌چنین حفظ جمعیت‌های بومی و حفاظت از ذخیره ژنی و تنوع ژنتیکی از دیگر مزایای این گونه مطالعات می‌باشد (Dunham، ۲۰۰۴). تغییرات شدید آب و هوایی سالیان اخیر و هم‌چنین آلودگی‌های نفتی سرعت افول و انقراض ارگانیسم‌های زنده را بالا برده و گونه‌ای مهم را در معرض انقراض قرار داده است. در این رابطه می‌توان اذعان کرد که تنوع زیستی با تخریب زیستگاه‌های جانداران به دست انسان، تخلیه زباله‌ها و پساب‌ها در رودخانه‌ها و دریاها هم‌چنان از چالش‌های مهم در حفظ ذخایر ژنتیکی است.در این راستا ایجادبانک‌های بزرگ بافت و DNA ژنومی از موجودات زنده در بسیاری از کشورهای جهان ازجمله منطقه خلیج فارس و دریای عمان در راستای نگه‌داری نسخه‌هایی از ژنوم ذخایر ارزشمند ژنتیکی مهم می‌باشد. متاسفانه در وضعیت موجود ساماندهی ساختار و تمرکز مدیریت بر منابع ژنتیکی آبزیان حوزه خلیج فارس و دریای عمان از طریق ایجاد یک شبکه منسجم ذخایر ژنتیکی آبزیان این منطقه وجود ندارد و شناسنامه‌ای از ذخایر ژنتیکی و گونه‌های در معرض خطر گیاهی و جانوری در این منطقه ایجادنشده است. میگوهای جنس پنائوس(*Penaeus*) یکی از مهم‌ترین ذخایر آبزیان اقتصادی در دریای عمان و خلیج‌فارس می‌باشند که نقش مهمی در صنعت صید و صیادی در کشور ایفا کرده و در صنایع تکثیر و پرورش نیز نقش به‌سزایی را دارند. این گروه با ارزش و متنوع در آب‌های استوایی و نیمه‌استوایی در سراسر جهان یافت می‌شوند. درحالی‌که اطلاعات زیادی درباره فیزیولوژی این جنس با اهمیت اقتصادی وجود دارد، تحقیقات کمی در مورد نسبت‌های خویشاوندی و جمعیتی دراین گروه با ارزش انجام شده است(Baldwin و همکاران، ۱۹۹۸).گونه‌مهم غالب و اقتصادی جهت صید در استان هرمزگان گونه موزی می‌باشد که هم اکنون جهت تکثیر و رهاسازی این گونه اقدامات وسیعی در حال انجام است. گونه پرورشی در ایران گونه میگوی سفید هندی (*P. indicus*) می‌باشد، اگرچه گونه میگوی ببری سبز (*P. semisulcatus*) با دو واریته اختصاصی در بوشهر (دارای آنتن‌های بدون بند و نوارهای کم‌رنگ بر روی بدن) و هرمزگان (دارای آنتن‌های بند بند و نوارهای پر رنگ بر روی بدن) نیز هم اکنون به‌عنوان گونه‌ای مناسب در ارتباط با پرورش مورد توجه می‌باشد(Niamaimandi، ۲۰۰۶). توالی‌یابی میتوکندریایی با مقایسه نوکلئوتیدها و مشخص شدن اختلاف بین توالی‌های مختلف تعیین می‌گردد. ژنوم میتوکندری هر گونه از بی‌مهرگان که تا به امروز مورد بررسی قرار گرفته است باگونه دیگر متفاوت بوده است. همه این تنوع‌ها منعکس‌کننده تکامل میتوکندری در موجودات بوده و می‌توان نحوه تکامل موجودات را با استفاده از توالی‌یابی ژنوم میتوکندری آن‌ها بررسی نمود(Tjensvoll، ۲۰۰۸).روشن است که در بسیاری از گونه‌های ماهیان mtDNA دارای تغییرات قابل ملاحظه‌ای بوده و این تغییرات را می‌توان مبنای تفکیک ذخایر قرار داد (Brown، ۲۰۰۸). مطالعات نشان می‌دهد که ناحیه SrRNA ۱۶ دارای یک سرعت پایین تکاملی است بدین معنی که برای تفاوت‌های بین گونه‌ای بیش‌تر از درون گونه‌ای مفید است. SrRNA ۱۶ برای بررسی روابط فیلوژنتیک ماهیان در سطوح مختلف طبقه‌بندی استفاده شده است که عمدتاً به این دلیل است که این ژن بسیار حفاظت شده بوده و یک تکامل تدریجی و آهسته دارد. از دیگر علل انتخاب این ژن بالا بودن تعداد کپی این مولکول و پایداری آن در سلول است (Page و Holmes، ۱۹۹۸). ایجاد بانک ژن (DNA) و تعین فاصله ژنتیکی گونه‌های مهم و اقتصادی راهی است که ضمن حفظ گونه‌های ارزشمند و یا گونه‌های در معرض خطر به‌ویژه با ایجاد کتابخانه ژنی مطالعه ژن‌های متعدد مثل ژن‌های اقتصادی چون ژن‌های رشد، مقاومت به بیماری، مقاومت به نوسانات دمایی، نگه‌داری مطلوب از ذخایر ژنتیکی آبزیان و حفظ تنوع زیستی آنان می‌تواند در حفظ و بازسازی ذخایر این گونه‌ها در آینده و هم‌چنین استفاده محققان از گونه‌های ذخیره شده موثر باشد. این پژوهش در راستای ایجاد بانک ژن و تعین فاصله پنج گونه از میگوهای غالب منطقه خلیج فارس و دریای عمان دارد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مناطق جاسک، گواتر و هرمز که مهم‌ترین زیستگاه‌های گونه‌های مورد مطالعه می‌باشد به‌روش ترال کف انجام گرفت. نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی از مناطق هرمز با مشخصات جغرافیایی N ۰۶' ۵۷° و E ۲۹' ۵۶°، جاسک با مشخصات جغرافیایی N ۳۳' ۲۵° و E ۴۴' ۵۷° و گواتر با مشخصات جغرافیایی E ۳۵' ۶۱° N ۱۰' ۲۵° انجام گرفت. در نهایت از هریک از سه منطقه مذکور ۲۰ نمونه جمع‌آوری شد. از هر نمونه ۲ گرم از عضلات پشتی و پای شنا برداشته و در الکل اتیلیک خالص نگه‌داری و جهت استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شدند. هم‌چنبن از هر گونه به‌میزان ۲ گرم از عضله به‌صورت وکیوم شده در ازت مایع نگه‌داری شدند.

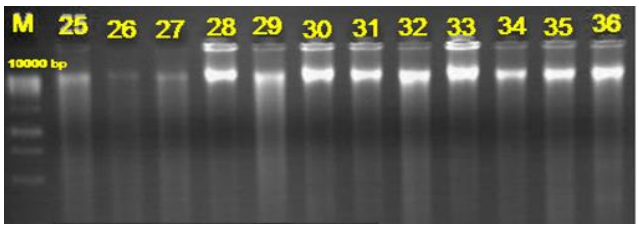
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129386

استخراج DNA: در این روش ابتدا ۵۰ میلی‌گرم از بافت عضلانی را در داخل تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری قرارداده و خرد گردید. سپس با استفاده از محلول استخراج شامل STE (Salt,Triss,EDTA)، پروتئیناز K (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و SDS ۲۰٪ (سدیم دودسیل سولفات) مرحله هضم سلولی انجام و با استفاده از فنل (PH=۸) و کلروفرم - ایزو آمیل الکل (۲۴ :۱) سانتریفوژ و در نهایت با استفاده از اتانول خالص کلاف‌های DNA رسوب داده شده و ارزیابی کیفی با استفاده از ژل‌آگارز و ارزیابی کمی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت (Taggart و همکاران، ۱۹۹۲).

تولید محصول PCR: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ترکیبی حدود ۱۰۰ نانوگرم از DNA استخراج شده در یک واکنش به میزان ۲۵ ماکرولیتر حاوی ۰/۶ ماکرولیتر از آغازگرهای (پیش‌رو معکوس) ۱۶ SarF (۵'-GCCTGTTTAACAAAAACAT-۳') ۱۶SbrR (۵'-CCGGTCTGAACTCAGATCATGT-3')، Simon و همکاران، ۱۹۹۱)، ۲ ماکرولیتر ۲۵ میلی‌مولار MgCl2 ، ۲/۵ ماکرولیتر ۱۰ میلی مولار dNTP (Promega USA)، ۵ ماکرولیتر ۵X PCR buffer (Promega) و ۵ واحد از Taq DNA polymerase (Promega) و ۱۱/۵ ماکرولیتر آب مقطر، اقدام به تولید محصول PCR شد. سیکل حرارتی استفاده شده شامل سیکل اولیه ۹۴ درجه به‌مدت ۴ دقیقه و ۳۰ ثانیه، به‌دنبال آن ۴۰ سیکل شامل دماهای واسرشته سازی (Denaturation) ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، اتصال (Annealing) ۴۸ درجه ۴۵ ثانیه، بسط و تکثیر (Extension) ۷۲ درجه به‌مدت ۱ دقیقه و در آخر دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه به‌مدت ۵ دقیقه بود. محصول PCR با استفاده از ژل آگاروز و رنگ‌آمیزی safe stain و با استفاده از اشعه UV مورد ارزیابی قرار گرفت. تصاویر از طریق دستگاه مستندساز ژل (شرکت Vilber Lourmant) با استفاده از برنامه نرم‌افزاری Photo capture انجام گردید. پس از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و ابزار Blast در پایگاه NCBI میزان همولوژی توالی‌های به‌دست آمده سنجیده شد. به‌منظور شناسایی اختلاف میان توالی‌ها، نمونه‌های توالی‌یابی شده با نرم افزار Clustal W هم‌ردیف شدند (Thompson ، ۱۹۹۷). درخت تکاملی به‌روش نزدیک‌ترین هم‌جواری (Neighbor-Joining) براساس مدل Kimura 2-parameter (Kimura، ۱۹۸۰) با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 رسم گردید.

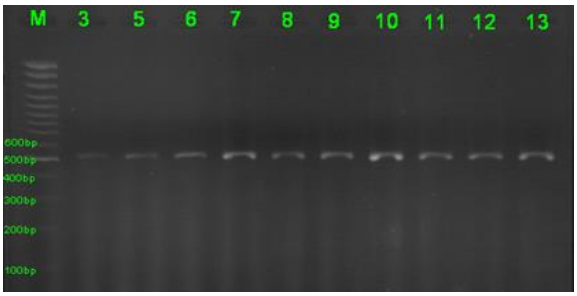
نتایج

استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم از بافت پای شنای ۴ گونه از میگوهای مورد مطالعه انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با دو روش استفاده از ژل آگارز یک درصد و مشاهده با اشعه ماوراء بنفش و دستگاه اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱: استخراج DNA با روش فنل-کلروفرم از بافت پای شنای ۵ گونه از میگوهای مورد مطالعه

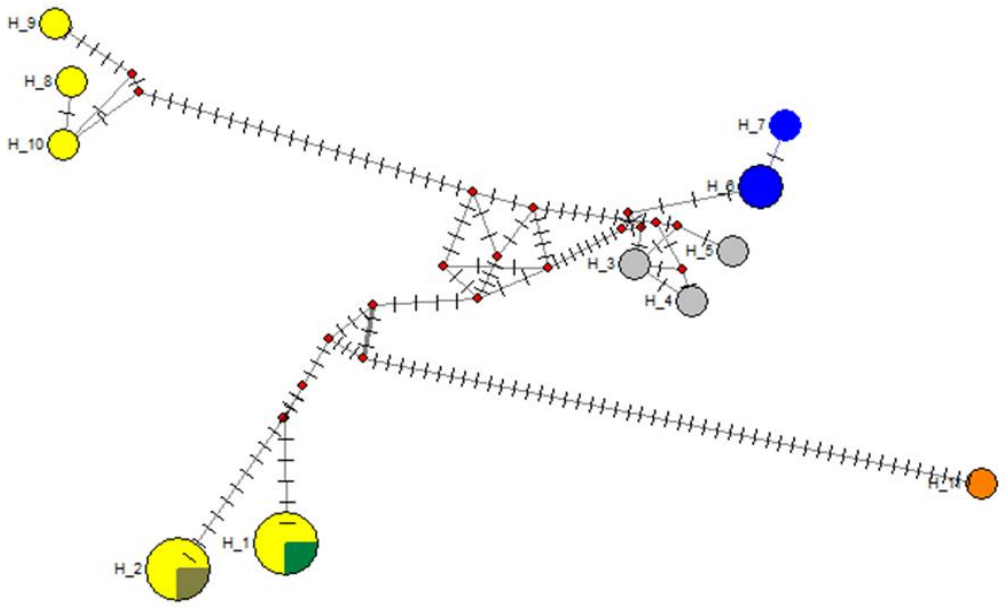
بهینه‌سازی واکنش PCR جهت تکثیر ژن SrRNA ۱۶ با استفاده از گرادیانت دمایی ۶۰- ۴۸ درجه سانتی‌گراد نشان داد که مناسب‌ترین دما برای اتصال آغازگر، دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد است. آغازگرهای Sar۱۶ و Sbr۱۶ امکان تکثیر بخشی از ژن SrRNA ۱۶ به طول تقریبی ۵۲۰ جفت باز را فراهم نمودند. الگوی باندی محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد در شکل زیر نمایش داده شده است (شکل ۲).



شکل ۲: محصول PCR با استفاده از ژن SrRNA ۱۶ روی ژل آگارز یک درصد

در این مطالعه داده ژن SrRNA ۱۶ تفاوت‌های ژنتیکی نسبتاً متوسط با ۰/۰۳ تنوع نوکلئوتیدی (۰/۳۰٪ فواصل ژنتیکی) بین دو morphotypes از گونه ببری سبز را نشان دادند که مشخص گردید که واریته بوشهر از لحاظ گونه‌ای می‌تواند گونه اندمیک منطقه خلیج فارس باشد (جدول ۱). بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین گونه‌های خانواده پناییده در این تحقیق بین گونه‌های *P. merguiensis* و *P. monodon* به‌میزان تقریبی ۱۲ درصد و کم‌ترین میزان بین گونه‌های *P. indicus* و *P. monodon* به‌میزان تقریبی ۱۰ درصد ثبت گردید.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129386



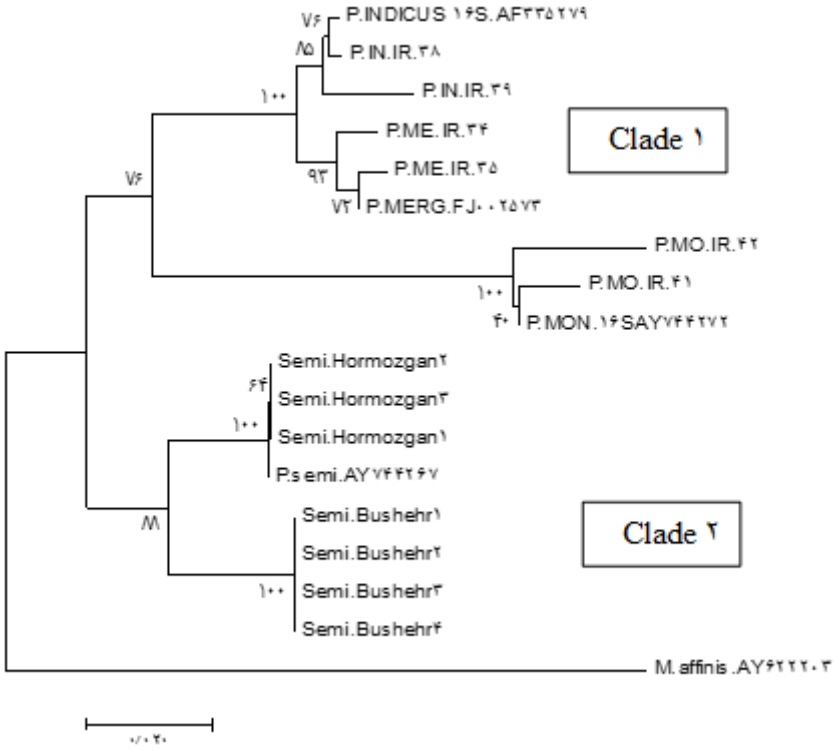
شکل ۳: ارتباط هاپلوتایپی توالی‌های مورد بررسی براساس Median-joining haplotype network (Bandelt و همکاران، ۱۹۹۹) ژن SrRNA ۱۶ (mtDNA) چهار گونه از میگوهای مورد مطالعه در منطقه خلیج‌فارس و دریای عمان به‌ترتیب در کلاد شماره ۱ هاپلوتایپ‌های ۱۰و۹، ۸ (*P. monodon*)، ۶ و ۷ (*P. indicus*). ۳،۴،۵ (*P. merguiensis*) و در کلاید شماره ۲ هاپلوتایپ‌های ۱ و ۲، نماینده دو واریته از میگو ببری سبز (*P. semisulcatus*) مشاهده می‌شوند. هاپلوتایپ شماره ۱۱ (*M. affinis*) به‌عنوان برون گروه درنظر گرفته شده است. خطوط مورب نشان‌دهنده تعداد جابجایی‌های نوکلئوتیدی در تفرق ژنتیکی بین گونه‌های مورد مطالعه می‌باشد.

جدول ۱ : درصد فاصله ژنتیکی با استفاده از ژن srRNA ۱۶ در بین گونه‌های مختلف مورد مطالعه

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. P.semi.AY744267																		
2. Semi.Hormozgan1	0.000																	
3. Semi.Hormozgan2	0.000	0.000																
4. Semi.Hormozgan3	0.000	0.000	0.000															
5. Semi.Bushehr1	0.038	0.035	0.035	0.035														
6. Semi.Bushehr2	0.038	0.035	0.035	0.035	0.000													
7. Semi.Bushehr3	0.038	0.035	0.035	0.035	0.000	0.000												
8. Semi.Bushehr4	0.038	0.035	0.035	0.035	0.000	0.000	0.000											
9. P.INDICUS 16S.AF335279	0.066	0.066	0.066	0.066	0.073	0.073	0.073	0.073										
10. P.IN.IR.38	0.069	0.066	0.066	0.066	0.073	0.073	0.073	0.073	0.004									
11. P.IN.IR.39	0.071	0.082	0.082	0.082	0.089	0.089	0.089	0.089	0.017	0.019								
12. P.ME.IR.35	0.071	0.077	0.077	0.077	0.080	0.080	0.080	0.080	0.025	0.025	0.029							
13. P.ME.IR.34	0.074	0.075	0.075	0.075	0.078	0.078	0.078	0.078	0.019	0.023	0.033	0.019						
14. P.MERG.FJ002573	0.071	0.069	0.069	0.069	0.071	0.071	0.071	0.071	0.013	0.015	0.019	0.000	0.002					
15. P.MO.IR.41	0.089	0.109	0.109	0.109	0.121	0.121	0.121	0.121	0.104	0.102	0.097	0.104	0.109	0.086				
16. P.MO.IR.42	0.097	0.116	0.116	0.116	0.129	0.129	0.129	0.129	0.117	0.117	0.121	0.119	0.119	0.093	0.034			
17. P.MON.16SAY744272	0.086	0.086	0.086	0.086	0.099	0.099	0.099	0.099	0.082	0.082	0.082	0.084	0.087	0.084	0.002	0.013		
18. M.affinis.AY622203	0.147	0.147	0.147	0.147	0.144	0.144	0.144	0.144	0.164	0.164	0.167	0.167	0.167	0.167	0.184	0.194	0.181	

توپولوژی حاصل از ترسیم درخت تکاملی Neighbor-Joining به‌روش فاصله Kimura 2-parameter بسیار عمیق بود که وجود دو کلاید و چهار کلاستر اصلی را نشان داد که نمونه‌های گونه‌های مونودون (چابهار)، مرگوییسیس (هرمز) و ایندیکوس (جاسک) همگی در کلاید اول قرار گرفتند. در کلاید دوم نمونه‌های میگوی سمیسولکاتوس در قالب دو کلاستر و دو واریته مجزا (بوشهر و هرمزگان) به‌صورت مشترک قرار داشتند و نمونه‌های میگوی آفینیس به‌صورت یک گروه جداگانه در قالب جنس متفاوت (متاپنئوس) به‌صورت برون گروه قرار گرفتند.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129386



شکل ۴ : درخت تکاملی ژن SrRNA ۱۶ میگوهای مورد مطالعه به‌روش Neighbor-Joining

بحث

در بررسی و مطالعات ژنتیکی به یک منبع اولیه از DNA نیاز می‌باشد. جهت استخراج DNA از بافت‌های آبزیان روش‌های مختلفی مثل‌روش فنل کلروفرم(Hillis و Moritz، ۱۹۹۰)،روش اتانول (Shaw، ۱۹۹۰)، CTAB(May و همکاران، ۱۹۹۷)و روش‌های‌دیگروجود دارد. هر یک از روش‌های عنوان شده مزایا و معایبی دارند. در تحقیق حاضر جهت‌استخراج DNA از پای‌شنای‌میگوهای‌موردمطالعه‌جهت استفاده در تهیه بانک ژن از روش فنل کلروفرم استفاده گردید. Wanna و همکاران (۲۰۰۴) جهت استخراج DNA از بافت منجمد شده ماهیچه و بررسی‌مولکولی جمعیت‌های گونه‌میگوی‌موزی از روش فنل کلروفرم استفاده نمودند.Khamnamtong و همکاران(۲۰۰۹) نیز جهت بررسی ساختار ژنتیکی میگوی‌ببری‌سیاه از روش فنل کلروفرم جهت استخراج DNA از پای منجمد شده میگو استفاده کردند. در این مطالعه داده ژن SrRNA ۱۶ تفاوت‌های ژنتیکی نسبتاً متوسط با ۰/۰۳ تنوع نوکلئوتیدی (۰/۰۳٪ فواصل ژنتیکی) بین دو morphotypes از گونه ببری سبز را نشان دادند که مشخص گردید که واریته بوشهر از لحاظ گونه‌ای می‌تواند گونه اندمیک منطقه خلیج فارس باشد. البته انجام مطالعات بیش‌تر و جامع‌تر در این زمینه اجتناب ناپذیر می‌باشد (جدول ۱).

در یک مطالعه که با استفاده از ژن SrRNA ۱۶ به‌وسیله Garcia-Machado و همکاران (۱۹۹۳) انجام گردید میزان بالایی از تفاوت درون گونه‌ای ناشی از جابجایی نوکلئوتیدی بین ۶ نمونه از میگو گونه *P. notialis* (به‌میزان ۰/۷ درصد) و هم‌چنین بین گونه‌ای بین گونه‌های *P. notialis* و *P. schmitti* (به‌میزان ۱۱ درصد) مشاهده گردید که بیانگر قدرت مناسب ژن SrRNA ۱۶ در جهت شناخت اختلافات ژنتیکی درون گونه‌ای و بین گونه‌ای در میگوهای خانواده پناییده می‌باشد.

در این مطالعه نیز بیش‌ترین‌فاصله ژنتیکی بین گونه‌های خانواده پناییده در این تحقیق بین گونه‌های *P. merguiensis* و *P. monodon* به‌میزان تقریبی ۱۲ درصد و کم‌ترین میزان بین گونه‌های *P. indicus* و *P. monodon* به‌میزان تقریبی ۱۰ درصد ثبت گردید.

از سوی دیگر توپولوژی حاصل از ترسیم درخت تکاملی Neighbor-Joining به‌روش فاصله Kimura 2-parameter بسیار عمیق بود که وجود دو کلاید و چهار کلاستر اصلی را نشان داد که نمونه‌های گونه‌های مونودون(چابهار)، مرگوییسنسیس(هرمز)واینديكوس(جاسک) همگی در کلاید اول قرار گرفتند. در کلاید دوم نمونه‌های میگوی

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129386

سمیسولکاتوس در قالب دو کلاستر و دو واریته مجزا (بوشهر و هرمزگان) به‌صورت مشترک قرار داشتند و نمونه‌های میگوی آفینیس به‌صورت یک گروه جداگانه در قالب جنس متفاوت (متاپنئوس) به‌صورت برون گروه قرار گرفتند (شکل ۴). یکی از اهداف مهم تهیه بانک ژن و حفاظت از گونه‌های بومی و اندمیک منطقه خلیج فارس می‌باشد. همه هاپلوتیپ‌های *P. semisulcatus* در یک کلاد عمده قرار گرفتند درحالی‌که مورفوتایپ متعلق به منطقه بوشهر در کلاستر متمایز دیگر قرار گرفت که مشخص گردید که واریته بوشهر از لحاظ گونه‌ای می‌تواند گونه اندمیک منطقه خلیج فارس باشد و لذا لزوم تهیه بانک ژن این واریته اجتناب‌ناپذیر می‌باشد که در این پروژه از این گونه بافت و DNA تهیه گردید. در این حال مشخص گردید که این توالی‌ها، قادر به تشخیص دو morphotypes به کلایدهای (شاخه‌ها) مربوطه خود بودند. Tsoi و همکاران (۲۰۰۵) بررسی و آنالیز فایلوژنی با استفاده از ژن SrRNA ۱۶ بر روی دو مورفوتایپ از میگوی *P. japonicas* را انجام دادند. این گونه به‌طور گسترده در سراسر منطقه هند و غربی اقیانوس آرام پراکنده است. این دو مورفوتیپ با الگوهای باندینگ رنگی مختلف در کاراپاس متمایز می‌شوند. با این‌حال، تفاوت‌های جداگانه‌ای در صفات مورفومتریک بین آن‌ها وجود ندارد. با این وجود نتایج نشان دادند که دو مورفوتایپ مورد بررسی بسیار به‌هم نزدیک هستند و همگی خود را در قالب یک کلاد جداگانه حاوی دو گروه خواهری (کلاستر) با اختلاف‌های نوکلئوتیدی در حدود ۱٪ (در قالب ۴۷۳ جفت باز) از دیگر نمونه‌های خانواده پنایید شامل *P. monodon*، *P. chinensis* و *P. merguiensis* خود را نشان دادند.

ثابت شده است که ژن SrRNA ۱۶ با جهش ژنی کم دارای یک نرخ پایین از تکامل می‌باشد (Mayer، ۱۹۹۴). به این معنی که ممکن است این ژن را بیش‌تر برای افتراق بین گونه‌ای از درون گونه‌ای به‌کار برد. به این ترتیب، با تجزیه و تحلیل این ژن (SrRNA ۱۶) به‌نظر می‌رسد که دو morphotypes ممکن است دو گونه متفاوت باشد. در همین ارتباط رسم شبکه هاپلوتایپی گونه‌های مورد مطالعه نیز بیانگر تفرق هاپلوتایپی نمونه مورد مطالعه است (شکل ۳).

ژن SrRNA ۱۶ برای بررسی روابط فیلوژنتیک ماهیان در سطوح مختلف طبقه‌بندی نیز استفاده شده است که عمدتاً به این دلیل است که این ژن بسیار حفاظت شده بوده و یک تکامل تدریجی و آهسته دارد. از دیگر علل انتخاب این ژن بالا بودن تعداد کپی این ژن و پایداری آن در سلول است (Page و Holmes، ۱۹۹۸).

از دیگر مطالعات دیگر می‌توان به مطالعات Palumbi و Benzie (۱۹۹۱) با استفاده از توالی‌هایی از قطعات mtDNA برای بررسی تفاوت‌های ژنتیکی بین گونه‌های میگوی خانواده پنایید اشاره کرد. این داده‌ها تفاوت ژنتیکی شگفت‌آور زیادی را در بین گونه‌هایی با خصوصیات مورفولوژیکی و اکولوژیکی مشابه نشان دادند. از آن‌جا که تفاوت‌های طبقه‌بندی شده براساس خصوصیات مورفولوژیکی تعریف می‌شوند، این نتایج حاکی از آن است که میزان تکامل مولکولی در مقابل تکامل مورفولوژیکی در میگو نسبت به پستانداران متفاوت است. شاید این امر به سرعت بیش‌تر تکامل mtDNA در میگو مربوط باشد و یا شاید با تثبیت انتخاب طبیعی در یک دوره زمانی طولانی، نرخ تغییرات مورفولوژیکی کاهش یافته است. در این‌حال امکان دارد که برای میگوهای خانواده پنایید، شباهت‌های مورفولوژیکی بتواند تفاوت‌های ژنتیکی زیادی را پوشش دهد.

در همین ارتباط Maggioni و همکاران (۲۰۰۱) بر روی دو مورفوتیپ از میگوی صورتی، *Farfantepenaeus subtiliss* به‌عنوان "مورفوتیپ IIgI" با استفاده از توالی ژن SrRNA ۱۶ مطالعاتی انجام دادند. این مطالعه واگرایی ژنتیکی بالایی (۶-۴ درصد) در هنگام مقایسه این دو مورفوتایپ نسبت به یکدیگر و هم‌چنین نسبت به دیگر گونه‌های *Farfantepenaeus* نشان داد. یکی از علل اصلی ایجاد تفاوت‌های ژنتیکی در جمعیت‌های جانداران دریایی، توانایی گسترش و پراکندگی آن‌ها است. لذا در صورتی که یکی از مراحل زندگی موجودات دریایی حالت پلانکتونی داشته باشد، گسترش آن‌ها ممکن است در فواصل مختلف اتفاق بیافتد که این امر موجب واگرایی ژنتیکی و تفرق گونه‌ای با توجه به تحمل شرایط محیطی زیستگاها دارد. هم‌چنین شرایط هیدرولوژیک مناطق و هم‌چنین توانایی گسترش و پراکندگی آن‌ها بر میزان جریان ژنی تاثیرگذار هستند (Garcia و Reset، ۱۹۸۱). از طرف دیگر افزایش بازده اقتصادی در سیستم‌های آبزی‌پروری عمیقاً به برنامه‌های اصلاح نژاد و آمیزش‌های هدفمند بین مولدین وابسته است. به همین دلیل امروزه اغلب مراکز بزرگ تکثیر مخصوصاً میگو این برنامه‌ها را با هدف بهبود صفات رشد، بازماندگی و یا مقاومت در مقابل بیماری راه‌اندازی نموده‌اند. با این‌حال این خطر همواره وجود دارد که در درازمدت، عدم شناسایی و ضعف مدیریت صحیح بر ذخایر ژنتیکی و عدم مطالعات جامع در ارتباط با تعین فاصله ژنتیکی بین مولدین موجب افزایش ضریب هم‌خونی در جمعیت‌های والدی در کارگاه‌های تکثیر گردد. افزایش ضریب هم‌خونی باعث کاهش تنوع ژنتیکی می‌گردد که به نوبه خود توان پاسخ به انتخاب را در نسل‌های آتی کاهش داده و در نهایت منجر به کاهش رشد، بازماندگی و خصوصیات تولیدمثلی خواهد شد. با توجه به زادآوری بالا در میگوها، در برنامه‌های آمیزش انتخابی، نیاز به تعداد اندکی مولد در لاین والدی وجود دارد که همین امر احتمال قرابت ژنتیکی والدین انتخاب شده از بین جمعیت پرتعداد پیش‌مولد را افزایش می‌دهد. در مطالعه حاضر تجزیه و تحلیل DNA میتوکندری وضوح خوب واگرایی ژنتیکی میان گونه‌های مختلف مورد اقدام برای تهیه بانک ژن و استفاده بهینه در امر تکثیر و پرورش و

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129386

اصلاح نژاد را نشان داد. در همین ارتباط، این نوع تحلیل را می‌توان به‌عنوان یک ابزار مهم برای در انتخاب مولدین در امر باز سازی ذخایر این گونه‌ها استفاده کرد. در این مورد می‌بایست، مدیریت‌های مختلف در برنامه broodstocking گونه‌های مورد مطالعه با توجه به فاصله ژنتیکی آن‌ها مخصوصاً برای دو مورفوتایپ از گونه *P. semisulcatus* اجرا گردد.

نشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از گزارش نهایی پروژه ایجادبانک ژن میگوهای بومی وسخت‌پوستان خلیج‌فارس و دریای‌عمان می‌باشد که بدین‌وسیله از کلیه همکاران در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان و هم‌چنین موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور که در این تحقیق همکاری داشته‌اند تشکر و قدر دانی می‌گردد.

منابع

۱. **کشاورزی، ف.، ۱۳۹۲.** بررسی تنوع ژنتیکی میگوی موزی *Fenneropenaeus merguiensis* در خوریات لافت و سیریک با استفاده از توالی‌یابی ژن SrRNA ۱۶ میتوکندریایی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشگاه هرمزگان. ۷۶ صفحه.

۲. **Ardura, A.; Ana Rosa, L.; Josino, C.M. and Vazquez, E.G., 2010.** DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. Biological Conservation. Vol. 143, pp: 1438-1443.

۳. **Baldwin, J.D.; Bass, A.L.; Bowen, B.W. and Clark, W.C., 1998.** Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 10, pp: 399-407.

۴. **Bandelt, H.; Forster, P. and Röhl, A., 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution. Vol. 16, pp: 37- 48.

۵. **Brown, R.P.; Terrasa, B.; Pérez-Mellado, V.; Castro, J.A.; Hoskisson, P.A.; Picornell, A. and Ramon, M.M., 2008.** Bayesian estimation of post-Messinian divergence times in alearic Island lizards. Molecular Phylogenetics. Vol. 48, pp: 350-358.

۶. **Dunham, R.A., 2004.** Aquaculture and fisheries biotechnology Genetic Approaches. CABI Publishing, University of Auburn. Cambridge, MA 02139. 385 p.

۷. **Eaton, M.J.; Meyers, G.L.; Kolokotronis, S.O.; Leslie, M.S.; Martin, A.P. and Amato, G., 2009.** Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. Conservation Genetics.

۸. **Garcia-Machado, E.; Dennebouy, N. and Suarez, M.O., 1993.** Mitochondrial 16s-rRNA gene of two species of shrimps: Sequence variability and secondary structure. Crustaceana. Vol. 65, No. 3, pp: 279-286.

۹. **Garcia, S. and Reset, L.L., 1981.** Life cycles, dynamics, exploitation and management of coastal penaeid shrimp stock. FAO Fishery Technical Report. pp: 203-215.

۱۰. **Hillis, D.M. and Moritz, C., 1990.** Molcular taxonomi. Sinauer associate, Inc. Publishers. Massachusetts.

۱۱. **Khamnamtong, B.; Klinbunga, S. and Menasveta, P., 2009.** Genetic Diversity and Geographic Differentiation of the Gaint Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand Analyzed by mithochondrial COI sequencs. Biochem Genet. Vol. 47, pp: 42-55.

۱۲. **Kimura, M., 1980.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution. Vol. 16, pp: 111-120.

۱۳. **Maggioni, R.; Rogers, A.D. and Maclean, N., 2003.** Population structure of *Litopenaeus schmitti* (Decapoda: Penaeidae) from Brazilian coast identified using six polymorphic microsatellite loci. Molecular Ecology. Vol. 12, pp: 3213-3217.

۱۴. **May, B., 2003.** Allozyme variation. In: Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists, edited by EM Hallerman. American Fisheries Society, Bethesda, MD. pp: 23-36.

۱۵. **Meyer, A., 1994.** DNA technology and phylogeny of fish. Chapman & Hall, London. pp: 220-290.

۱۶. **Niamaimandi, N., 2006.** Bio-Dynamics and Life Cycle of Shrimp (*Penaeus semisulcatus*), in Bushehr Coastal Waters of the Persian Gulf. PhD thesis, Universiti Putra Malaysia.

۱۷. **Page, R.D.M. and Holmes, E.C., 1998.** Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

۱۸. **Palumbi, S.R. and Benzie, J., 1991.** Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar Penaeid

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129386

shrimp. Molecular Marine Biology and Biotechnology. Vol. 1, pp: 27-34.

۱۹. **Shaw, P.W.; Turan, C.; Wright, J.M.; O'connell, M. and Carvalho, G.R., 1999.** Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analysis. Heredity. Vol. 83, pp: 490-499.

۲۰. **Simon, C.; Franke, A. and Martin, A., 1991.** The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification Molecular Techniques in Taxonomy in: de Francisco, A.K. and Galetti Junior, P.M., 2005. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. Genetics and Molecular Biology. Vol. 28, No. 2, pp: 258-261.

۲۱. **Taggart, J.B.; Hynes, R.A.; Prodohal, P.A. and Ferguson, A., 1992.** A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. Journal of Fish Biology. Vol. 40, pp: 963-965.

۲۲. **Tjensvoll, K.; Hodneland, K.; Nilsen, F. and Nylund, A., 2005.** Genetic characterization of the mitochondrial DNA from *Lepeophtheirus salmonis* Crustacea; Copepoda. A new gene organization revealed. Gene. Vol. 3532, pp: 218-230.

۲۳. **Tsoi, K.H.; Wang, Z.Y. and Chu, K.H., 2005.** Genetic divergence between two morphologically similar varieties of the kuruma shrimp *Penaeus japonicas*. Marine Biology. Vol. 147, pp: 367-379.

۲۴. **Wanna, W.; Rolland, J.L.; Boahomme, F. and Phongdara, A., 2004.** Population genetic structure of *Penaeus merguiensis* in Thailand based on nuclear DNA variation. Journal of Experimental Marine Biology. Vol. 311, pp: 63-78.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.129386

Scientific Research Journal of Animal Environment Vol. 12, No. 4, Winter 2020

Gene bank preparation and genetic differentiation of endemic shrimp species from the Persian Gulf and Oman Sea

- **Saeid Tamadoni Jahromi*:** Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran
- **Mohsen Gozari:** Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran
- **Sajjad pourmozaffar:** Persian Gulf Mollusks Research Station, Persian Gulf and Oman Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar-e-Lengeh, Iran
- **Mitra Arman:** Department of Biology, Payam Noor University, Tehran, Iran
- **Abdolreza Jahanbakhshi:** Offshore Fisheries Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran

Received: December 2019 Accepted: March 2020

Key words: Gene bank, 16 SrRNA, Persian Gulf, Shrimp

Abstract

The critical status of marine living habitats as well as the oil pollution caused by the water balance of the tankers as well as the effluent of the shrimp farms are now accelerating the decline and extinction of living organisms and endangering important economies species. It is therefore important to create genomic banks of living organisms in order to maintain copies of the genome of valuable genetic stocks of marine resources. In this study, genetic identification and gene bank preparation of 4 important species of shrimp in the Persian Gulf (*P. semisulcatus*, *P. indicus*, *P. merguiensis*, *P. monodon*, *M. affinis*) were performed. Sampling were performed in Autumn 2017 by trawl method from Bushehr, Jask, Goatr and Hormuz areas, which are the most important biodiversity of the studied species, Total DNA was extracted using phenol-chloroform method. PCR amplification was performed to amplify the 16SrRNA gene. After sequencing, genetic distance between sequences was measured. The results showed that sequences of two morphotypes of *P. semisulcatus* sampled from Bushehr and Hormozgan with significant genetic difference of about 0.03 were able to differentiate the two morphotypes in their respective clades. In this study, the highest genetic distance between the species of *P. merguiensis* and *P. monodon* was 12%. The genetic distances between *P. indicus* and *P. monodon* was recorded 10% as well.

* Corresponding Author's email: stamadoni@gmail.com